

538,882

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 7 月 1 日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/054610 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 39/02, A61P 31/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016180

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 17 日 (17.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-366769
2002 年 12 月 18 日 (18.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社テクノネットワーク四国 (TECHNO NETWORK SHIKOKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒760-0033 香川県高松市丸の内 2 番 5 号 Kagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大島 俊一郎 (OSHIMA, Syunichirou) [JP/JP]; 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200 高知大学農学部水族病理学内 Kochi (JP). 近藤 基樹 (KONDO, Motoki) [JP/JP]; 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200 高知大学農学部水族病理学内 Kochi (JP). 川合 研児 (KAWAI, Kenji) [JP/JP]; 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200 高知大学農学部水族病理学内 Kochi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VACCINE FOR FISH COLD-WATER DISEASE

(54) 発明の名称: 魚類冷水病ワクチン

(57) Abstract: It is intended to provide a vaccine for cold-water disease. Namely, a vaccine for fish cold-water disease which contains, as the active ingredient, inactivated cells of *Flavobacterium psychrophilum* in the logarithmic growth phase or a component thereof.

(57) 要約: 冷水病ワクチンの提供。フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチン。



WO 2004/054610 A1

明 細 書

魚類冷水病ワクチン

技術分野

本発明は、魚類冷水病ワクチン及びこれを用いた魚類冷水病の予防法に関する。

背景技術

冷水病は、サケ、マス、アユ、フナ等に低水温期に発病する病気である。もともとは北米のマス類の病気で、低水温期の稚魚に発生し死亡率が高い病気である。死亡率は20～50%であるが、死亡しない魚でも体表に潰瘍などの後遺症が残るという問題がある。

冷水病の治療手段としては、水温を上昇させる、スルフィソゾールナトリウムの経口投与等が行なわれているが、水温を25℃以上に上昇させるのは経済的に負担が大きすぎ、薬物投与は食用魚としては好ましくない。

冷水病の原因菌はフラボバクテリウム サイクロフィラム (*Flavobacterium psychrophilum*) であることが判明している。しかし現在までこれに対するワクチンは開発されていない。なお、フラボバクテリウム サイクロフィラムは、フレキシバクター サイクロフィルス、又はサイトファーガー サイクロフィルスと呼ばれることもある。

発明の開示

本発明の目的は魚類冷水病ワクチンを提供することにある。

そこで本発明者は冷水病の原因菌であるフラボバクテリウム サイクロフィラムの各種培養条件による病原性及びワクチン活性について検討してきたところ、

全く意外にも定常期の菌体よりも対数増殖期の菌体を用いた場合に特にワクチン活性が高いことを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチンを提供するものである。

また本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を含有する魚類冷水病ワクチン組成物を提供するものである。

さらに本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分の有効量を投与することを特徴とする魚類冷水病の予防法を提供するものである。

本発明のワクチンを用いれば、サケ、マス、アユ等の冷水病が効率的に防止できる。

図面の簡単な説明

図1は、本菌の培養時間と600nmにおける光学密度(OD)及び菌数(CFU/mL)との関係を示す図である。

図2は、本菌の培養条件によるアユに対する病原性(累積死亡率)を示す図である。

図3は、本菌の菌体成分のSDS PAGE分析結果を示す図である。

図4は、本菌の対数増殖期(36h, A及びB)と定常期(48h, C及びD; 72h, E及びF)の菌体の走査型顕微鏡像(A, C, E=20,000倍, B, D, F=100,000倍)を示す図である。

図5は、本菌の対数増殖期における菌体の超薄切片の透過型電子顕微鏡像を示す図である。

図6は、本菌がアユの下あごに感染した様子を走査型顕微鏡像で示す図である。

図 7 は、攻撃 1（ワクチン投与 3 週後攻撃）における生残率を示す図である。

図 8 は、攻撃 2（ワクチン投与 7 週後攻撃）における生残率を示す図である。

図 9 は、死亡したアユの症状を示す図である（矢印部は、冷水病特有の症状を示す）。

図 10 は、死亡したアユの蛍光抗体法による本菌の感染の有無についての診断結果を示す図である（矢印部が本菌の感染部）。

図 11 は、フラボバクテリウム サイクロフィラム NCMB 1947 の培養条件によるニジマスに対する病原性（累積死亡率）を示す図である。

図 12 は、A：対照群の健康なニジマスを示す図である。B、C、D：浸漬攻撃後 1 日目に死亡したニジマスの症状を示す図である（矢印部は冷水病特有の症状を示す）。E、F：浸漬攻撃後 5 日目に死亡したニジマスの症状を示す図である（矢印部は冷水病特有の症状を示す）。G、H：死亡したニジマスの尾鰭から発見されたフラボバクテリウム サイクロフィラムを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のワクチンは、フラボバクテリウム サイクロフィラム（以下、本菌とすることがある）の対数増殖期の不活化菌体又はその成分を用いる。通常、細菌を培養した場合、誘導期、対数増殖期、定常期、死滅期及び生残期に分けられる。本発明者が本菌が魚類生体に侵入している様子を観察したところ、侵入している菌体表面に多くの小胞が観察された。一方、本菌の誘導期、対数増殖期及び定常期の菌体について SDS-PAGE による産生物の差異及び形態を観察したところ、対数増殖期の菌体表面に小胞及び分泌物が存在することが明らかになった。

本発明のワクチンに用いる菌体は、本菌を常法により培養し、対数増殖期に採取することにより得られる。本菌の培養は、本菌を適当な培地に接種し常法に従って培養すればよい。培地中には、資化し得る炭素源及び窒素源を適量含有さ

せておくのが好ましい。

この炭素源及び窒素源については特に制限はないが、その例としては、窒素源としてトリプトン、各種動物血清、コーングルテンミール、大豆粉、コーンステープリカー、カザミノ酸、酵母エキス、ファーマメディア、イワシミール、肉エキス、ペプトン、ハイプロ、アジパワー、コーンミール、ソイビーンミール、コーヒー粕、綿実油粕、カルチベータ、アミフレックス及びアジプロン、ゼスト、アジックスなどが挙げられる。また、炭素源としては、資化し得る炭素源、例えば、アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、蔗糖、麦芽糖、可溶性デンプン、乳糖、廃糖蜜や資化し得る有機酸、例えば酢酸等が挙げられる。また、その他、リン酸、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ などの無機塩や、必要であれば、無機、有機微量栄養源を培地中に適宜添加することもできる。またTY培地、サイトファーガー（CYT）培地等の市販の培地、改変サイトファーガー（MCYT）培地、及びこれらに牛胎児血清を添加した培地を用いることもできる。

培養条件は、pH 6.8～7.8、4～20℃とするのが好ましい。

本菌が対数増殖期にあるか否かの確認は、600nmでの光学密度を測定することにより行なわれる。すなわち600nmでの光学密度が急激に上昇する時期が対数増殖期である。例えばpH 7.3、15℃で培養した場合、培養20～30時間が対数増殖期である。

対数増殖期にある本菌を遠心分離、濾過等により分離するか、培養物をそのまま不活化する。不活化処理としては加熱処理、ホルマリン処理等が挙げられる。

本菌の成分には、菌体の膜成分、小胞及び分泌物が含まれる。これらの成分を採取するには、不活化菌体の超音波破碎等により行なうのが好ましい。

得られた不活化菌体又はその成分は、濾過、エバポレーション、濃縮、凍結乾燥等により濃縮して用いるのが好ましい。

本菌の不活化菌体又はその成分は、そのままワクチンとして使用してもよい

が、薬学的に許容される液状又は固体状の担体とともにワクチン組成物として使用してもよい。当該ワクチン組成物の形態としては、経口投与用組成物、注射用組成物、魚類浸漬用組成物、飼料組成物等が挙げられる。液状の担体としては水、生理食塩水等が挙げられる固体状の担体としては、タルク、シュクロースなどの賦形剤が挙げられる。飼料組成物とするには、通常の魚類の飼料に本菌の不活化菌体又はその成分を混合すればよい。また、これらのワクチン組成物にはアジュバントを添加して抗原性を高めてもよい。

本発明のワクチン又はワクチン組成物の投与は、成魚でもよいが、冷水病に罹患する前、例えば稚魚の段階が好ましい。その投与量は、体重1 kgあたり不活化菌体又はその成分として約1 mg～5 gが好ましい。投与回数は1回でもよいが、複数回、例えば2～10回が好ましく、また毎日投与でもよいが1～2日間隔をあけて投与してもよい。

本発明のワクチン又はワクチン組成物の対象魚類としては、本菌による冷水病になる魚類であれば制限されず、例えばアユ、フナ、ヤマメ、ニジマス、ギンザケ等のサケマス類等が挙げられる。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

実施例1

(1) フラボバクテリウム サイクロフィラム G 3 7 2 4 (以下の実験でもこの株を使用した。) の一白金耳を4 mLのMCYT培地(トリプトン2.0 g、酵母エキス0.5 g、肉エキス0.2 g、酢酸ナトリウム0.2 g、塩化カルシウム0.2 g、蒸留水1000 mL、pH7.2)に接種し、15℃で2日間培養後、そのうちの0.5 mLを200 mL MCYT培地に接種し、15℃で振盪培養した。培養時間と菌体数及び600 nmにおける光学密度との関係を図1に示す。図1か

ら明らかなように、本菌は0～24時間までが誘導期であり、24～48時間までが対数増殖期であり、48時間以降が定常期であることがわかる。

(2) 本菌の各種培養条件による病原性の差異について検討した。すなわち、対数増殖期及び定常期の本菌を $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/mLとなるようにアユの水槽に添加し、病原性を検討した。なお、対照としたアユは0.5～5gであり、水槽の温度は15℃とした。その結果、図2に示すように対照群（非感染群）に比べて定常期の本菌感染群は10日目までの死亡率が20～60%だったのに対し、対数増殖期の本菌感染群は10日目の死亡率が100%であり、定常期の菌に比べて対数増殖期の菌の病原性が高いことが判明した。

(3) 段階の異なる本菌の菌体を超音波破碎した。その画分についてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS PAGE，銀染色）を行なった。結果を図3に示す。その結果、対数増殖期に特異的に産生される物質（図中の矢印）があることが判明した。

(4) 対数増殖期及び定常期の本菌についての走査型顕微鏡観察（図4）及び透過型電子顕微鏡観察（図5）を行なった。その結果、対数増殖期には菌体表面に小胞が存在することが判明した。

(5) 対数増殖期の本菌をアユに感染させ、本菌がアユの下あごに侵入している様子を走査型顕微鏡で観察した（図6）。その結果、小胞を有する対数増殖期にある本菌がアユ生体に侵入していることが判明した。

実施例 2

フラボバクテリウム サイクロフィラムG3724を2000mL容坂口フラスコ中で1000mL MCYT培地中15℃で培養した。OD600nmが0.2～0.7のものを対数増殖期菌体として用いた。すなわち、培養24～36時間の間のOD600nmが0.2～0.7の時期の培養物を、0.3%ホルマリン中で15℃、2日間インキュベーションして不活化菌体とし、次いで4℃で8,000～10,000×gで遠心分離して不活化菌体とした。また、対照と

して培養36時間経過後（OD600nm＝1.0）の培養物を同様に不活化して定常期不活化菌体を得た。

実施例3

フラボバクテリウム サイクロフィラム G3724の一白金耳を50mLのMCYT培地に接種し、15℃で48時間予備培養した。このうち2.5mLを1000mLのMCYT培地に接種し、15℃で36時間培養した。このときOD600nmは0.2～0.7であった。培養物を0.3%ホルマリン中で15℃、2日間インキュベーションした。次いで、4℃で8,000～10,000×gで遠心分離して菌体を採取した。得られた菌体をさらに0.3%ホルマリン生理食塩水に再懸濁し、本菌の不活化菌体を含むワクチン組成物を得た。

実施例4

平均体重5.0gのアユに、実施例2で得た対数増殖期及び定常期の菌体から得た不活化菌体を、0.1FKCg/kg/dayで経口投与した。

このように経口投与したアユに対して浸漬攻撃実験を行なった。その結果を表1に示す。

表1

群	攻撃量(CFU/mL)	死亡/攻撃	生残率(%)
対数増殖期群	1.7×10^8	39/152	74 ^{a,c}
定常期群	1.9×10^8	39/105	63 ^b
対照群	2.2×10^8	82/165	50

a: 対照群に対して有意差あり(P<0.001)chi-square検定

b: 対照群に対して有意差あり(P<0.05)

c: 定常期群に対して有意差あり(P<0.05)

表1より定常期群及び対数増殖期群ともに対照群に対して生残率に有意差があった。しかし、対数増殖期群の生存率は、定常期群のそれよりも有意に高く、対数増殖期群がワクチンとして特に有用であることが判明した。

実施例5

実施例 3 で得たワクチン組成物を用いてワクチン効果を検討した。すなわち、攻撃試験開始 5 週間前からワクチンを 2 週間経口投与（0.1 g/kg）を行ない、その後、3 週間免疫活性を上昇させる為に通常飼料で飼育を行なった。その後、3 週間後に攻撃試験を実施する区と、ワクチン投与終了から、7 週後に攻撃試験を実施する 2 区を設定し、攻撃試験を実施した。

0.5 g のアユの 2000 尾に対して、ワクチンを毎日経口投与した区と、2 週間で 5 回投与した（中 2 日で経口投与）区の 2 区を設けた。結果を表 2、図 7 及び図 8 に示す。

表 2

	平均体重(g)	攻撃量(CFU/mL)	死亡数/攻撃数	生残率(%)
攻撃1 ^a				
1	1.7		7/118	94.1 ^b
2	1.8	4.4×10 ⁷	4/119	96.6 ^b
対照	1.8		36/117	69.2
攻撃2 ^a				
1	1.9		53/114	53.5 ^b
2	1.8	1.2×10 ⁸	10/120	91.7 ^b
対照	1.9		79/121	34.7
攻撃1 ^a				
1	2.7		26/186	86.6 ^b
2	2.9	2.1×10 ⁷	20/168	88.1 ^b
対照	2.7		41/174	76.4
攻撃2 ^a				
1	2.7		40/170	76.5 ^b
2	3.0	1.4×10 ⁸	36/165	78.8 ^b
対照	3.2		107/185	42.2

a : 攻撃1 : ワクチン投与後3週後攻撃、攻撃2 : ワクチン投与後7週後攻撃

b : 対照群に対して有意差あり (P<0.01)

1 : 2週間毎日ワクチン投与群

2 : 2週間で5回ワクチン投与群

その結果、ワクチン投与 3 週間後に攻撃試験を実施した結果では、ワクチン投与区と対照区では有意差が認められた。また、5 回だけ投与した区は、毎日投与した区よりもワクチン効果が非常に高いことが明らかとなった。

さらに、ワクチン投与後、7週間で攻撃試験を実施した場合、ワクチンを投与した両区において対照区よりも有意にワクチン効果が高かった。

本試験期間中に死亡した供試魚について、本菌による死亡か否かを確認した結果、図9及び図10に示すように、死亡魚全てについて冷水病の典型的な症状が認められ、さらに、蛍光抗体法により死亡魚を診断した結果、検査した全ての個体で陽性に染色されたことから、本試験期間中に死亡した試験魚は、本菌の感染を原因とするものであることが明らかになった。

実施例6

フラボバクテリウム サイクロフィラム NCMB1947をMCYT培地中15℃の振盪培養し、培養24～48時間の間のOD600nmが0.2～0.7の対数増殖期の培養液を人工感染に用いた。すなわち、対数増殖期の本菌を $10^6 \sim 10^8$ CFU/mLになるようにニジマス水槽に添加し、浸漬方法による人工感染を試みた。なお、供試したニジマスは1～4gであり、水温は15℃とした。その結果、図11に示すように対照群（非感染群）の死亡率が0%であったのに対して、対数増殖期の本菌感染群は死亡率が55.8%であり、本菌の浸漬方法によるニジマスに対する人工感染に初めて成功した。図12に健康なニジマス（A）、1日目に死亡したニジマスの症状（B、C、D）、5日目に死亡したニジマスの症状（E、F）及び死亡したニジマスの尾鰭から発見されたフラボバクテリウム サイクロフィラムを示す。

請求の範囲

1. フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチン。
2. フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を含有する魚類冷水病ワクチン組成物。
3. フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分の有効量を投与することを特徴とする魚類冷水病の予防法。

図 1

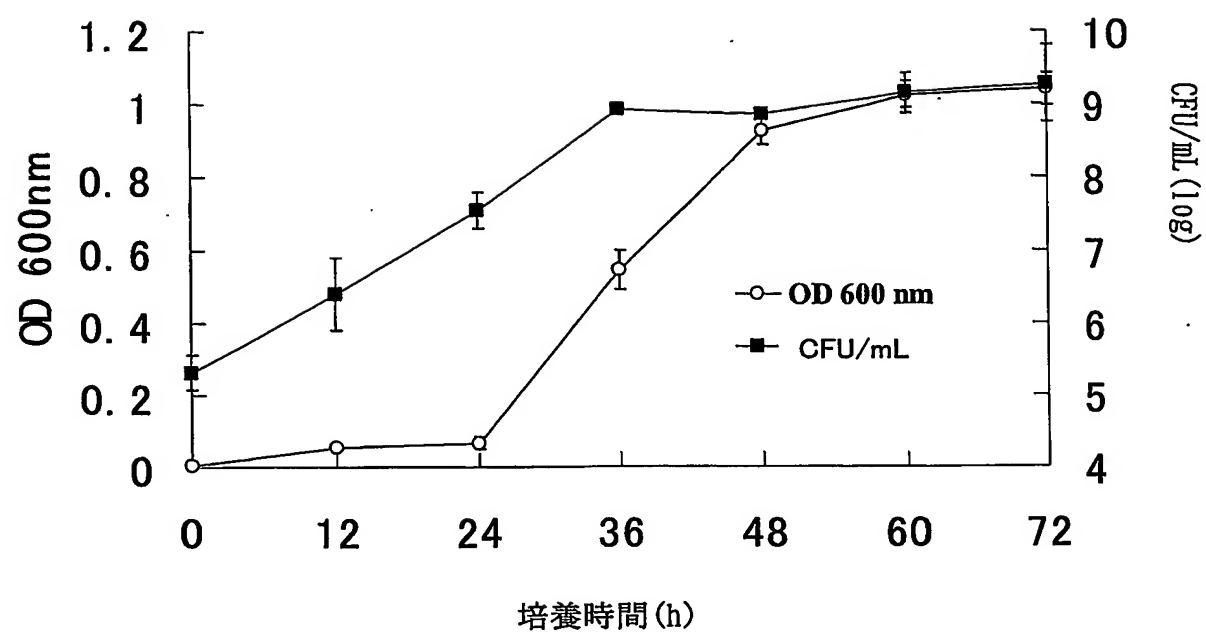
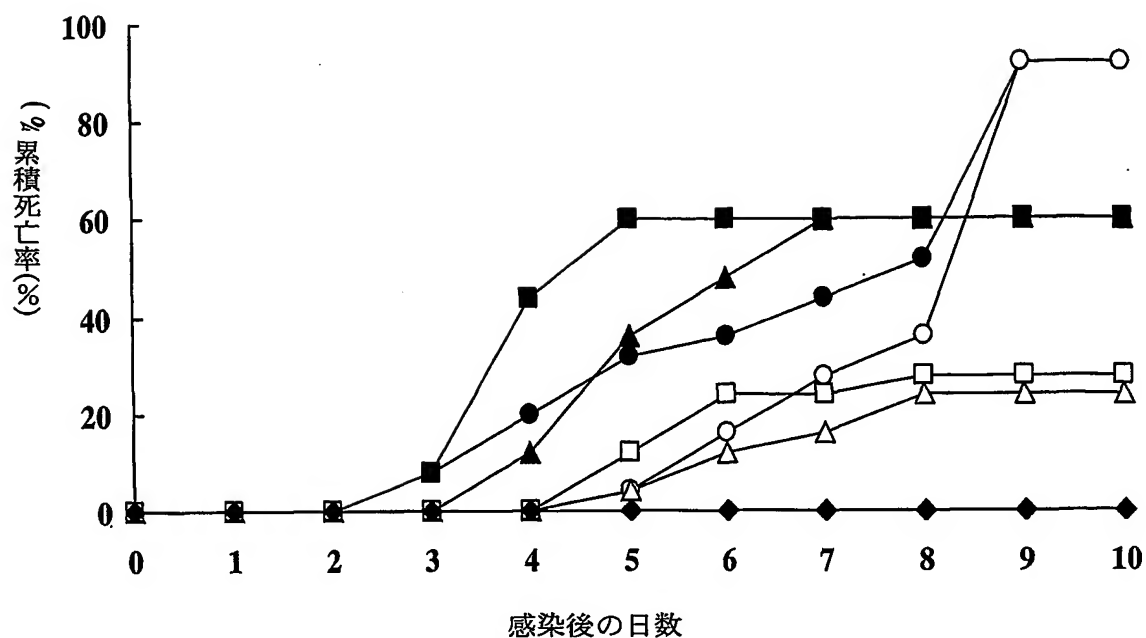
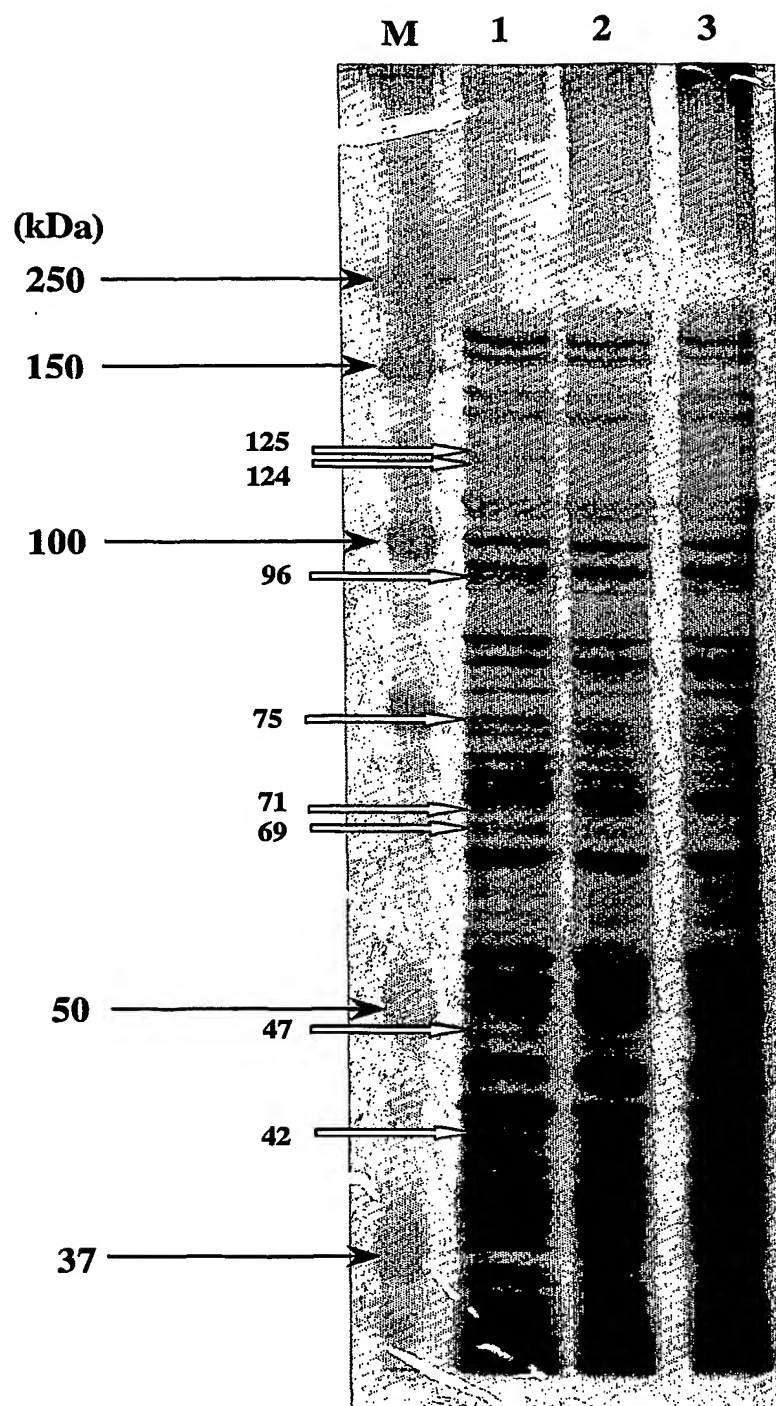


図 2



- : 対数増殖期(36h, $10^{9.5}$ CFU/mL)
- : 対数増殖期(36h, $10^{8.5}$ CFU/mL)
- ▲ : 定常期(48h, $10^{9.9}$ CFU/mL)
- △ : 定常期(48h, $10^{8.9}$ CFU/mL)
- : 定常期(72h, $10^{10.2}$ CFU/mL)
- : 定常期(72h, $10^{9.2}$ CFU/mL)
- ◆ : 対照群(非感染群)

図 3



M : 分子量マーカー

レーン 1 : 対数増殖期 (36h)

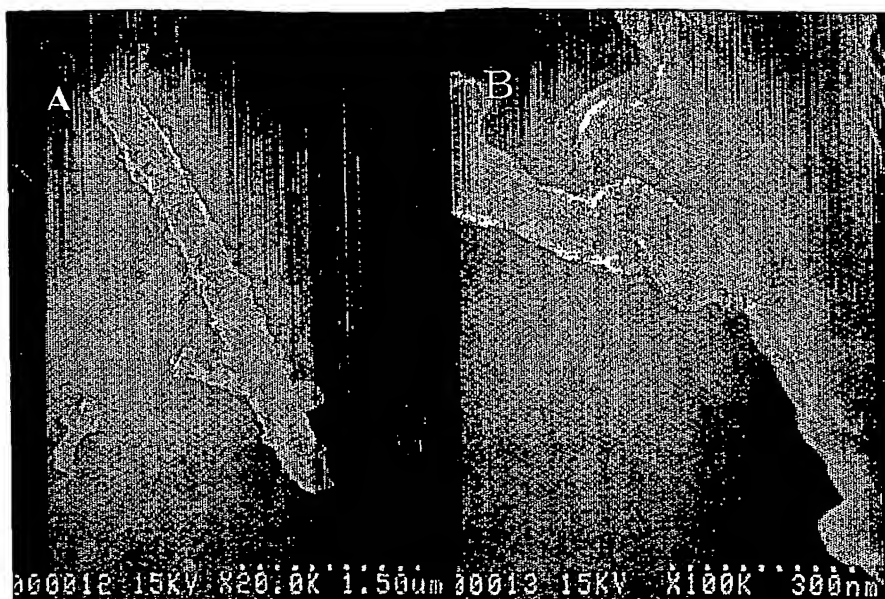
レーン 2 : 定常期 (48h)

レーン 3 : 定常期 (72h)

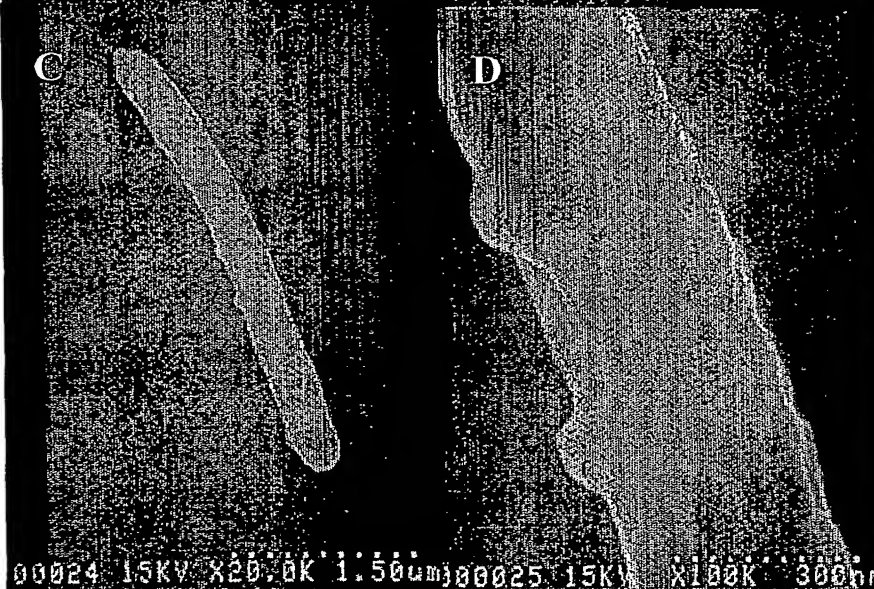
矢印 : 対数増殖期に特異的なバンド

図 4

対数増殖期 (36h)



定常期 (48h)



定常期 (72h)

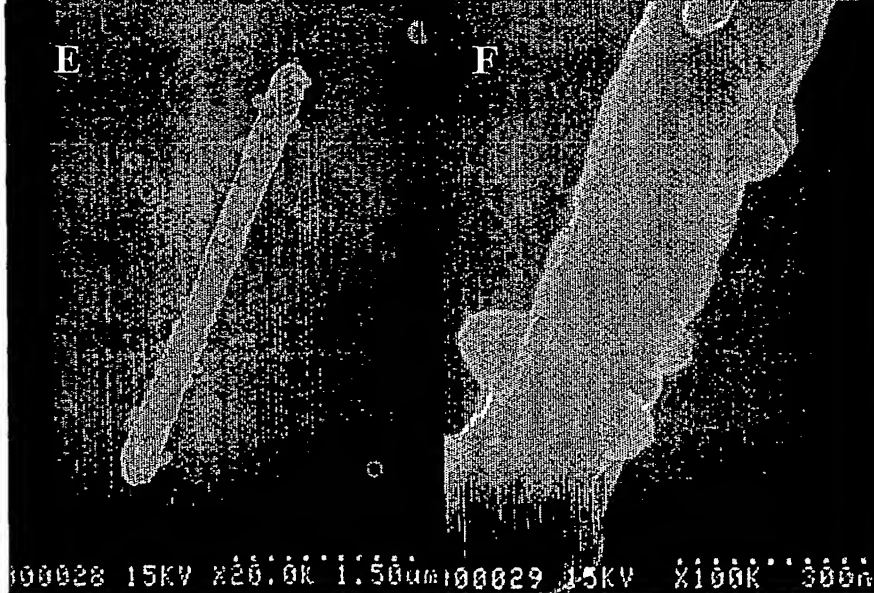
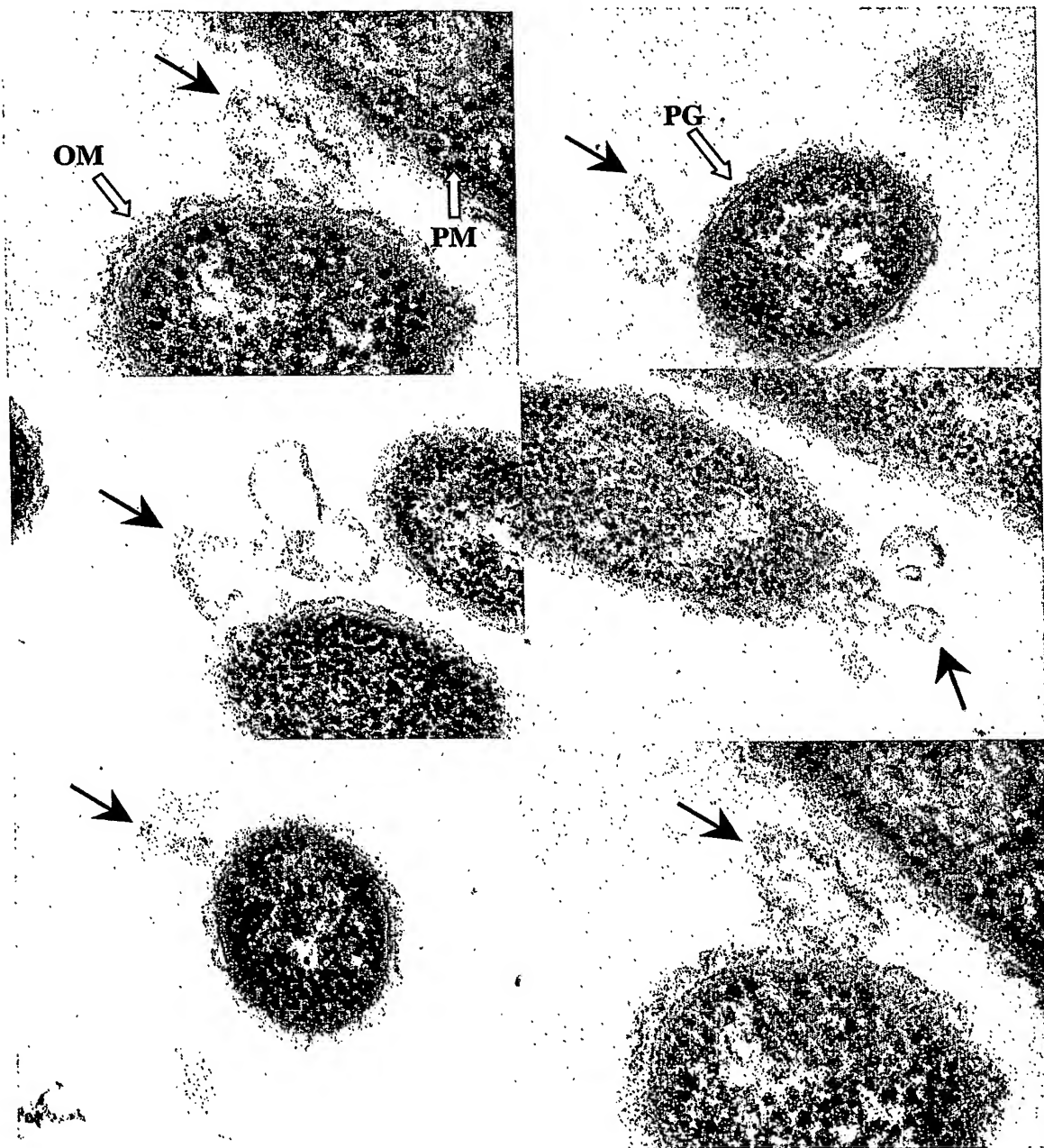


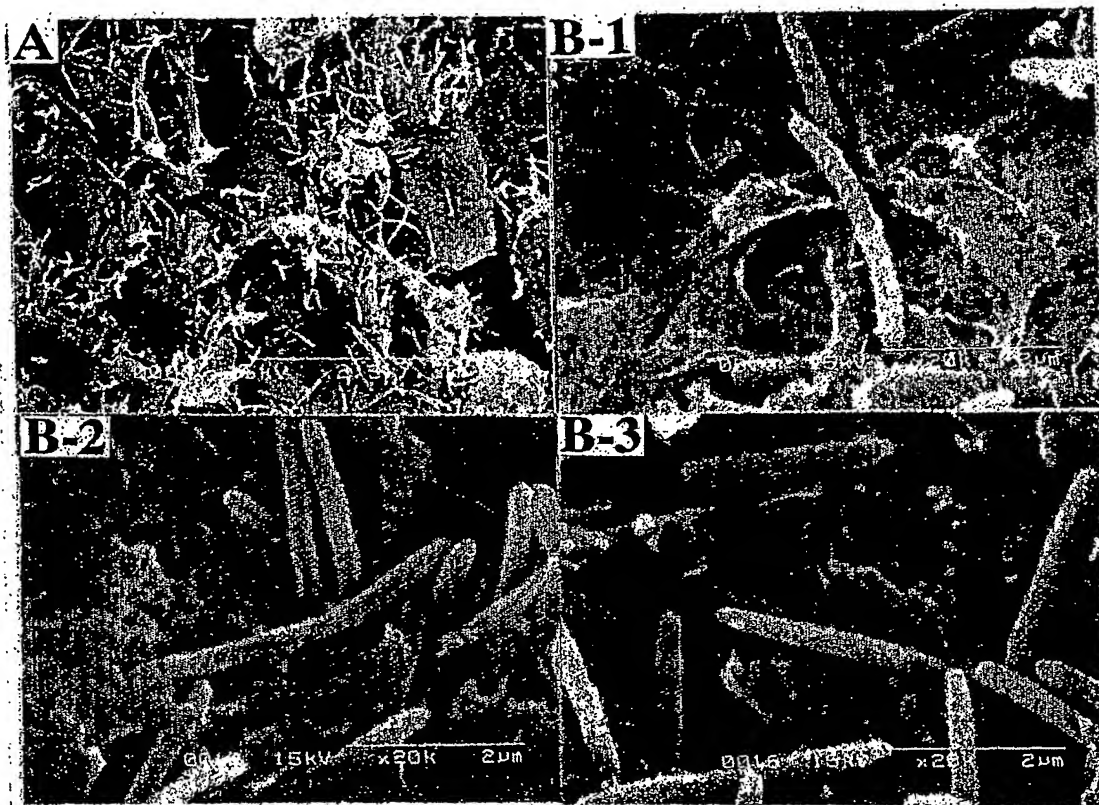
図 5



OM : 外膜
PG : ペプチドグリカン層
PM : プラズマメンブラン
矢印 : 細胞表面の突起

BEST AVAILABLE COPY

図 6



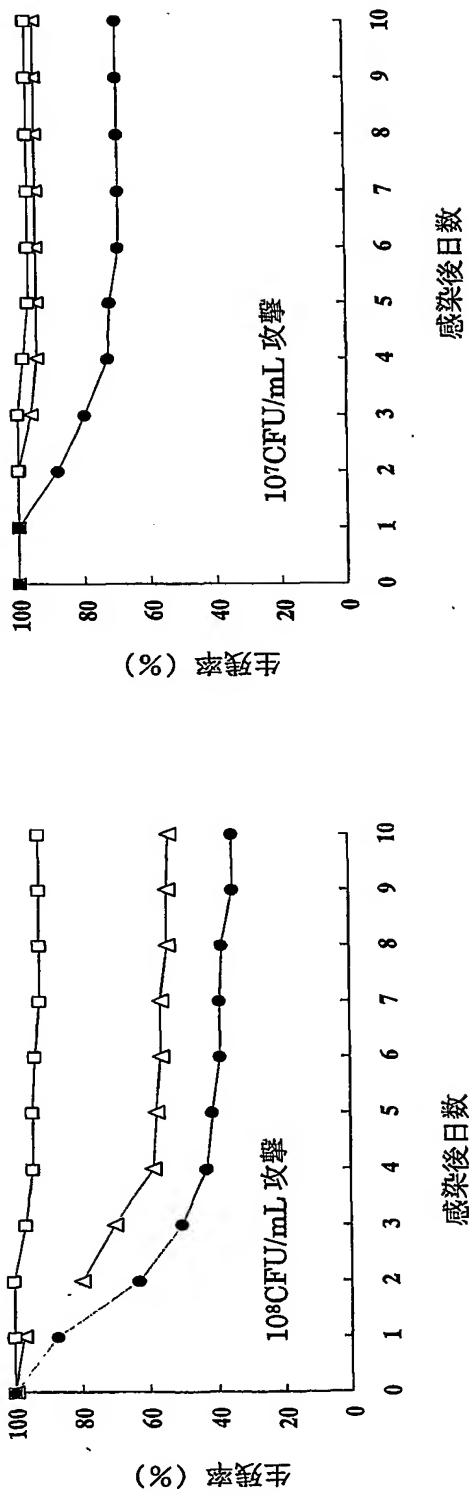
A=2,500 倍

B=20,000 倍

BEST AVAILABLE COPY

図 7

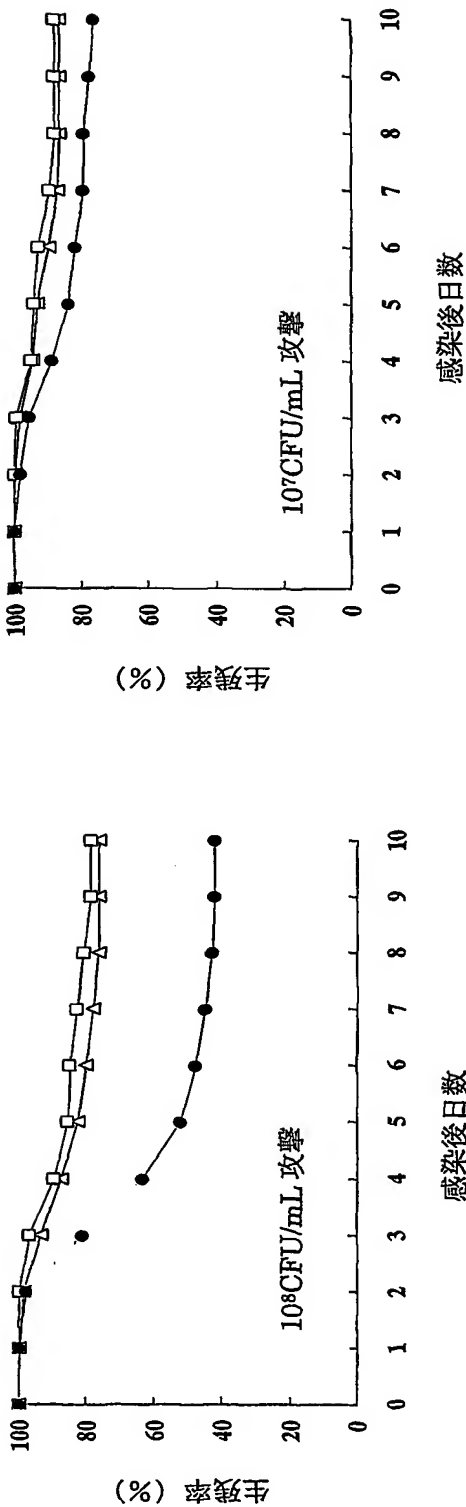
攻撃 1 (ワクチン投与 3 週後)



△: 毎日投与
□: 2 週間で 5 日投与
●: 対照群

図 8

攻撃 2 (ワクチン投与 7 週後)



△ : 毎日投与
□ : 2週間で5日投与
● : 対照群

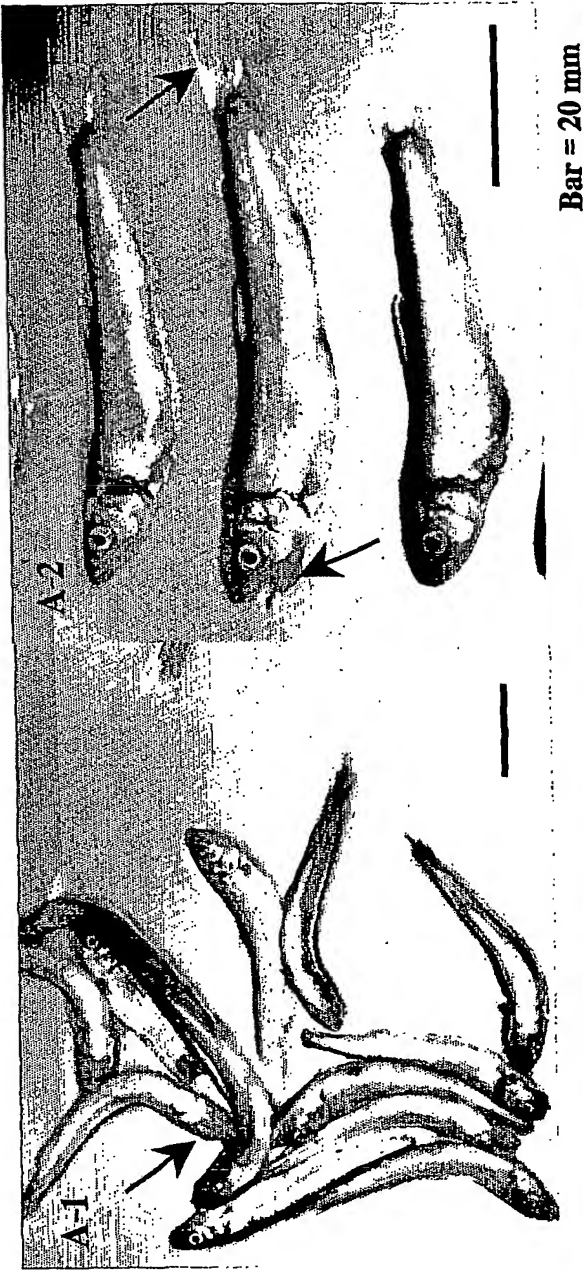


図 9

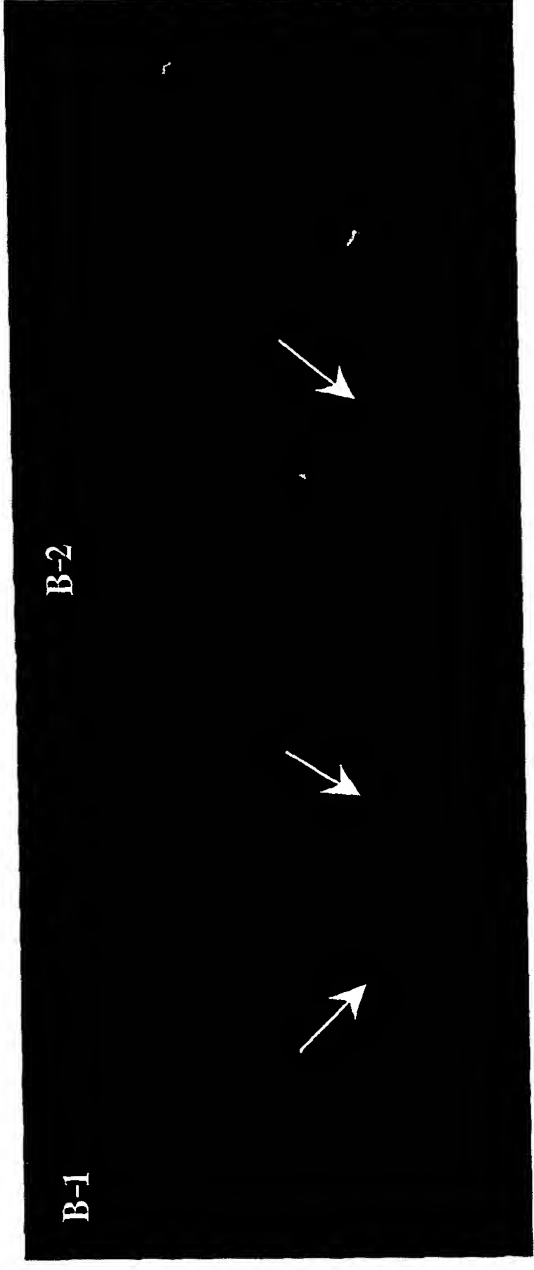


図 10

×1,000

図 1 1

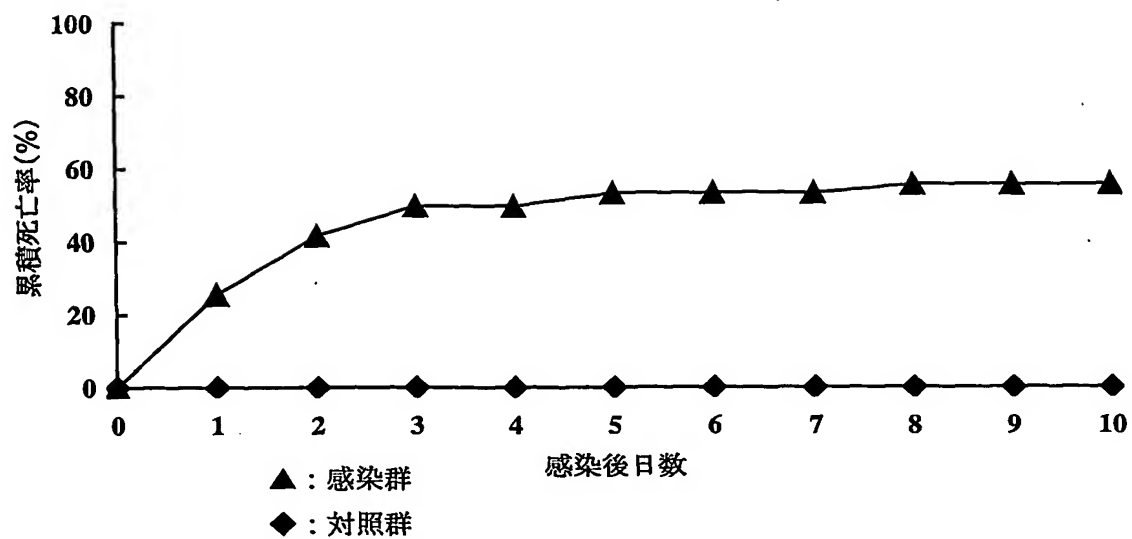
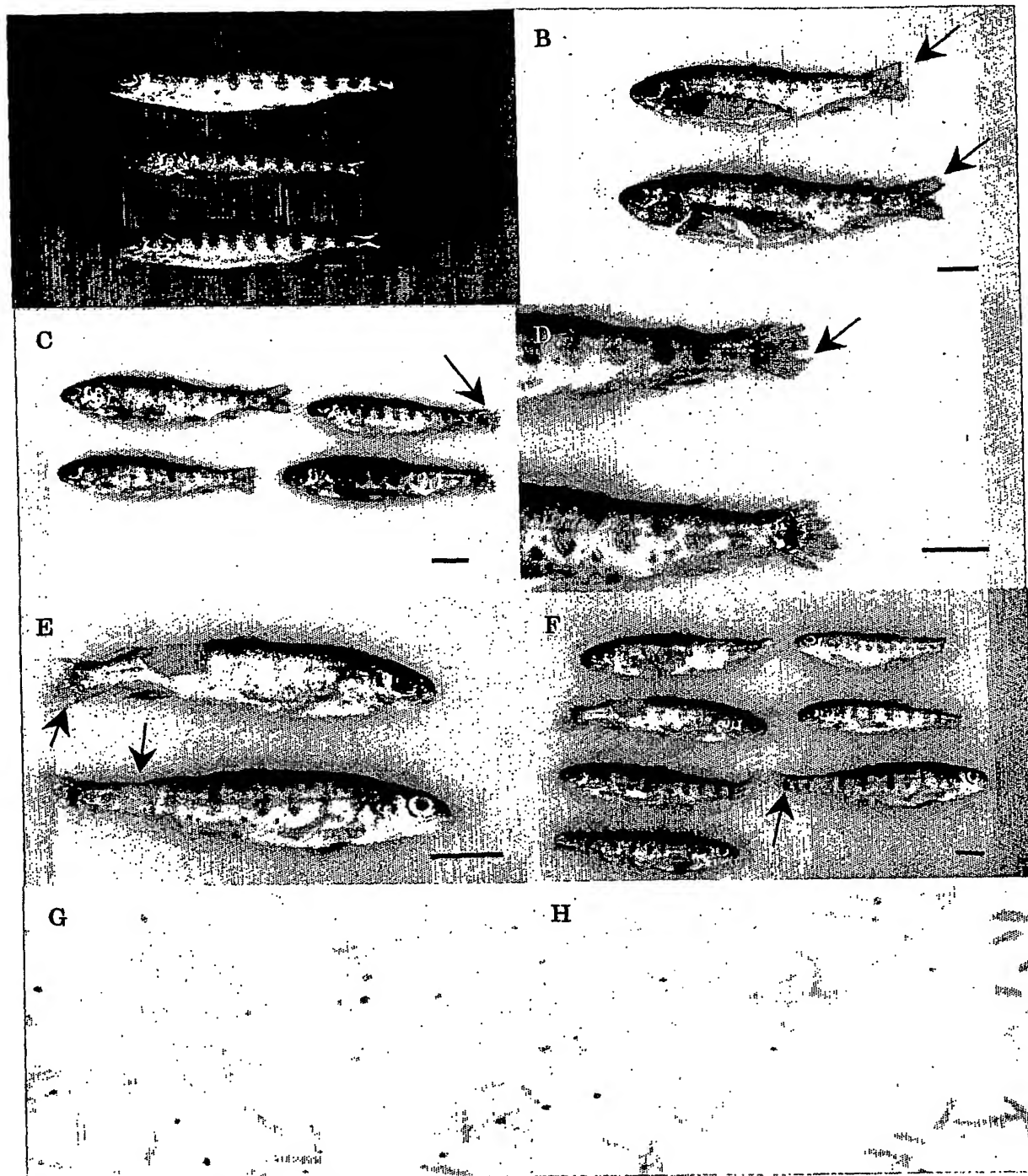


図 1 2



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K39/02, A61P31/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K39/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JMEDplus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nobufumi MASUNARI et al., "Ayu no Reisuibyo ni	1-3
Y	Taisuru Chusha Vaccine no Yobo Koka", Bulletin of the Fisheries Experiment Station, Okayama Prefecture, 2001, No.16, pages 49 to 57; Zairyo to Hoho; Fig. 1	1-3
Y	Edited by Kokuritsu Yobo Eisei Kenkyusho Gakuyukai "Nihon no Vaccine", revised edition 2, Maruzen Co., Ltd., 1977, pages 400 to 401	1-3
Y	JP 7-501333 A (SmithKline Beecham Corp.), 09 February, 1995 (09.02.95), Page 4, upper left column, line 18 to upper right column, line 6 & WO 93/10216 A1 & US 5401743 A	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
25 March, 2004 (25.03.04)

Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hideo HARA, "Ayu no Reisuibyō ni Taisuru Keikuchi Vaccine no Kenkyū-I", Bul.Kanagawa Pref.Fish.Res. Inst., 30 March, 2001 (30.03.01), No.6, pages 109 to 112	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/02, A61P31/04, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JMEDplus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	増成伸文 他, アユの冷水病に対する注射ワクチンの予防効果,	1-3
Y	岡山県水産試験場報告, 2001, No. 16, p. 49-57, 材料と方法, Fig. 1	1-3
Y	国立予防衛生研究所学友会 編, 日本のワクチン, 改訂2版, 丸善株式会社, 1977, p. 400-401	1-3
Y	J P 7-501333 A (スミスクライン・ピーチャム・コーポレイション) 1995. 02. 09, 第4頁左上欄第18行-右上欄第6行 & WO 93/10216 A1 & US 5401743 A	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 03. 2004

国際調査報告の発送日

13. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4 C

3 1 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	原日出夫, アユの冷水病に対する経口ワクチンの研究-I, Bull. Kanagawa Pref. Fish. Res. Inst., 2001. 3. 30, No. 6, p. 109-112	1-3